

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

1958

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

FREISETZUNG VON SEROTONIN DURCH HÄMOLYTIKA,
BAKTERIELLE UND TIERISCHE GIFT

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Helmut Springer

aus Lednicka Lehota (C. S. R.)

Würzburg 1958





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153524_0328

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

FREISETZUNG VON SEROTONIN DURCH HÄMOLYTIKA,
BAKTERIELLE UND TIERISCHE GIFTE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Helmut Springer

aus Lednicka Lehota (C. S. R.)

Würzburg 1958

Referent: Privatdozent Dr. E. Habermann

Korreferent: Professor Dr. Dr. W. Neumann

Tag der Promotion:

31. 3. 58

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

MEINEN LIEBEN ELTERN

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Eigene Versuche	3
A) Methodik:	
1. Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten	3
2. Testung von Serotonin am Magenstreifenpräparat der Ratte	6
B) Ergebnisse:	9
a) isolierte Thrombocyten	
1. Versuche mit Hämolytika:	
Digitonin	9
Desoxycholsäure	10
Lysocithin	11
2. Versuche mit Bienengift:	
Fraktion I	12
Phospholipase A	14
Fraktion II	15
3. Versuche mit Schlangengiften:	
Naja tripudians	15
Crotalus terrificus	16
Vipera ammodytes	16
4. Versuche mit Gift von Clostridium Welchii:	
Kulturflüssigkeit	17
Fraktion P I	19
5. Compound 48/80	20
6. Hemmung durch Lysergsäurediäthylamid	21
b) isoliertes Rattenzwerchfell	28
c) unanästhesiertes Kaninchen	31
III. Besprechung	35
IV. Zusammenfassung	38
V. Literatur	I

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.

Die Indolalkylamine sind bis vor kurzem als eine Gruppe von aktiven Substanzen von zwar bedeutendem pharmakologischem, aber geringem physiologischem Interesse betrachtet worden. Größere Aufmerksamkeit wandte man ihnen zu, als das 1948 von RAPPORT, GREEN und PAGE aus Blut isolierte Serotonin, die von REID und RAND im Serum festgestellte und mit Thrombocytin bezeichnete Substanz und schließlich das von ERSPAMER aus enterochromaffinen Zellen verschiedener Gewebe isolierte Enteramin weitgehenden Parallelismus in ihren pharmakologischen Eigenschaften aufwiesen. Alle drei Komponenten wurden schließlich als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) identifiziert.

ERSPAMER (1) fand 5-HT im Magendarmtrakt und verschiedenen Drüsen; TWAROG und PAGE sowie CRAWFORD und AMIN konnten auf hohen 5-HT-Gehalt in Gehirn und Zentralnervensystem hinweisen, BHATTACHARYA und LEWIS berichteten über 5-HT-Gehalt im Rattengewebe. HABERMANN (2) konnte papierchromatographisch und papierelektrophoretisch im Hornissengift neben Histamin und einem Cholinester auch 5-HT nachweisen. Das Vorkommen dieser Substanz in Wespengift wurde von JAUQUES und SCHACHTER beschrieben.

Schon lange vermutete man, daß die im Blute vorkommende vasokonstriktorische Substanz nicht frei vorliegt, sondern aus Blutzellen, und im besonderen aus Blutplättchen erst frei wird. Ihre hohe Konzentration in Thrombocyten ist seit längerer Zeit bekannt. Kaninchenthrombocyten sind besonders reich an 5-HT. Bei der Blutgerinnung soll diese Substanz freiwerden. Der Gehalt des Serums an 5-HT wäre also ein dem Gerinnungsprozess zuzuschreibendes Artefakt. Umgekehrt ist auch die aktive Aufnahme von 5-HT durch Thrombocyten in vitro nachgewiesen worden (HUMPHREY und TOH, sowie BRODIE).

Beim Zerfall von Thrombocyten in der Milz oder in anderen Organen wird 5-HT frei und wird dann, nach Ansicht von ERSPAMER (1), entweder von neuen Thrombocyten wieder aufgenommen, in den Organen selbst von Zellen gespeichert oder durch Enzyme abgebaut. Es ist nichts bekannt über die Be-

dingungen, unter welchen eine mögliche "physiologische" 5-HT-Freisetzung aus intakten zirkulierenden Blutplättchen vor sich gehen könnte.

ERSPAMER (1) nimmt an, daß sich die Bildung von 5 HT in den enterochromaffinen Zellen des Magendarmtraktes aus L-Tryptophan über 5-Hydroxytryptophan vollzieht, die Substanz dann an das Blut abgegeben und ausschließlich von den Thrombocyten aufgenommen wird. Diese sollen dazu durch besondere molekulare Gruppen befähigt sein.

Über die physiologische Bedeutung von 5-HT bestehen mehrere Ansichten. Man schreibt der Substanz einen Einfluß bei der Blutstillung zu, da sie die Gefäße zu verengen vermag; durch Änderung des Gefäßtonus soll sie Bedeutung bei der physiologischen Regulierung des Blutdruckes haben, und ERSPAMER bezeichnet 5-HT als ein Hormon mit nierenregulierender Funktion. Nach WOOLLEY und SHAW soll 5-HT eine wichtige Rolle beim normalen Ablauf der Gehirnprozesse spielen. Diese Ansicht vertreten auch PLETSCHER, SHORE und BRODIE.

In letzter Zeit wurden mehrere Arbeiten über 5-HT-Freisetzung veröffentlicht. So berichteten BHATTACHARYA und LEWIS (2) über eine 5-HT-Freimachung durch "Compound 48/80" aus den Mastzellen von Rattengewebe. TOH gelang eine Freisetzung aus Thrombocyten durch Gewebsextrakte, HUMPHREY und JAKES wiesen 5-HT bei anaphylaktischen Reaktionen nach. Die meisten bisher bekannten Versuche wurden jedoch mit Reserpin und anderen Rauwolfia-Alkaloiden unternommen. WAALKES und WEISSBACH stellten nach Reserpin-Injektion eine 5-HT-Zunahme im Blut fest, während CARLSSON, SHORE und BRODIE mit der gleichen Substanz in vitro aus Blutplättchen 5-HT freizusetzen vermochten.

Da bakterielle und tierische Gifte verschiedene Wirkstoffe aus lebendem Gewebe freisetzen, welche ihrerseits bei der Vergiftung eine Rolle spielen können (vergl. z. B. BOQUET) und nachdem Serotonin als körpereigenes Pharmakon in letzter Zeit erkannt worden war, drängte sich die Frage auf, ob diese Substanz nicht durch derartige Giftstoffe in freien Zustand gebracht werden könnte. Wir versuchten zunächst, ob - in Anlehnung an Versuche von STRIEBECK - aus dem isolierten Rattenzwerchfell neben Histamin auch 5-HT austritt; vor allem sollte geprüft werden, ob bakterielle und tierische Gifte

und vielleicht ganz allgemein Hämolytika Serotonin aus Thrombocyten austreten lassen. In orientierenden Versuchen wurde schließlich der Blutspiegel dieser Substanz bei vergifteten Tieren zu erfassen versucht.

II. EIGENE VERSUCHE

A) Methodik

1. Serotoninfreisetzung aus Thrombocyten

Wir gewannen Kaninchenthrombocyten nach der Methode von DILLARD, BRECHER und CRONKITE.

Die Methode beruht auf der Verwendung eines gerinnungshemmenden Mittels - in unserem Falle Versen = Natrium-Äthylendiamintetraacetat - zur Verhütung der Verklumpung und auf Differentialzentrifugierung zur Reinigung und Anreicherung der Blutplättchen. Die Versenlösung setzte sich aus 1 g Natrium-Äthylendiamintetraacetat (Na_2EDTA) und 0,7 g NaCl in 100 ml Aq. dest. zusammen und hatte ein pH von 6,6 - 6,7.

Eine Ohrvene bzw. -arterie eines Kaninchens wurde mit einer silikonierten V2A Stahl-Kanüle Nr. 1 punktiert; auf 1 ml Versenlösung ließ man 9 ml Blut in ein silikoniertes Zentrifugenglas tropfen. Das Blut wurde zuerst im Eisbad auf 5° abgekühlt und dann 50 Minuten lang bei 5° mit 30 g (Umdrehungszahl = 500/min., Stellung 36) in einer Servall-Zentrifuge zentrifugiert. Es ist wichtig, eine auch beim Auslauf sehr ruhige Zentrifuge zu verwenden, damit die Erythrocyten nicht aufgewirbelt werden. Erythrocyten und Leukocyten setzen sich bei dieser Umdrehungszahl ab, während die Blutplättchen im überstehenden Plasma angereichert werden. Mit einer silikonierten Pipette wurde das Überstehende in ein silikoniertes Zentrifugenglas abgehebert und erneut 50 Min. bei 5° mit 300 g (= 1800 U/min, Stellung 42) zentrifugiert. Auf diese Weise setzten sich die Blutplättchen als kompakte Masse am Boden und Rand des Zentrifugenglases ab. Die aus 10 ml Blut stammenden Thrombocyten wurden in den endgültigen Versuchen in 1 ml Plasma resuspendiert. Das mikroskopische Bild zeigte gut erhaltene und massenhaft vorhandene Thrombocyten von teils ovalen, teils zackigen

Formen, während Erythrocyten und Leukocyten bis auf ganz vereinzelte Exemplare (1 Zelle in 1-2 Gesichtsfeldern) fehlten.

Eine Reihe von Vorversuchen mußte die Frage der optimalen Stabilität bei Aufbewahrung und Bebrütung klären helfen.

Über das optimale Medium zur Aufbewahrung gibt folgender Ansatz Aufschluß:

Je 0,2 ml Thrombocyten wurden mit 1,8 ml Versen - NaCl (1 : 9)

bzw. 1,8 ml physiol. NaCl

bzw. 1,8 ml Plasma

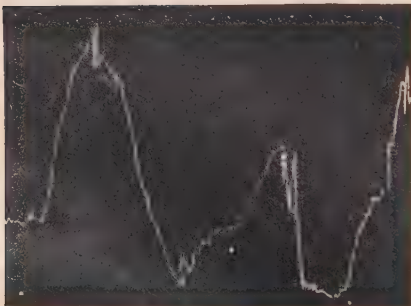
über Nacht im Eisschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die angesetzten Suspensionen am Magenstreifen der Ratte (s. S. 6) getestet:

1 ml Thrombocyten in Versen-NaCl entsprach 0,02 γ Serotonin

1 ml Thrombocyten in physiol. NaCl entsprach 0,02 γ Serotonin

1 ml Thrombocyten in Plasma entsprach 0,005 γ Serotonin



1 = 0,05 ml Thrombocyten in
physiologischer NaCl

2 = 0,1 ml Thrombocyten in
Plasma

3 = 0,1 ml Thrombocyten in
Versen/NaCl

Abb. 1: Prüfung der Stabilität von Thrombocyten in verschiedenen Medien.

Der erste Versuch zeigte also, daß Plasma den übrigen Konservierungsmitteln überlegen ist.

Nun mußten Arbeitsbedingungen gesucht werden, welche eine möglichst gute Haltbarkeit der Thrombocyten während des eigentlichen Versuchs gewährleisten. 0,2 ml in Plasma resuspendierter Thrombocyten wurden mit 3,8 ml physiol. NaCl versetzt und davon dann

1 ml	bei 25° im H ₂ O-Bad	30 Minuten stehen gelassen,
1 ml	bei 37° im H ₂ O-Bad	30 Minuten bebrütet,
1 ml + 0,5 ml n/10 HCl	bei 100°	5 Minuten erhitzt,

und mit 0,5 ml n/10 NaOH neutralisiert.

Es entsprachen

1 ml Thrombocyten-Suspension bei 25°	= 0,003 γ Serotonin
1 ml Thrombocyten-Suspension bei 37°	= 0,09 γ Serotonin
1 ml Thrombocyten-Suspension erhitzt	= 0,18 γ Serotonin

Während der 80 Minuten, die zur Austestung der Lösung benötigt wurden, konnte kein wesentlicher Anstieg der Aktivität beobachtet werden.

Nach diesen Vorversuchen erschien also folgende Handhabung der Thrombocyten optimal:

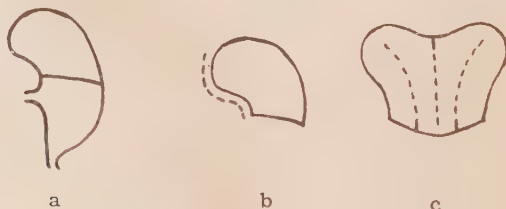
Die Blutplättchensuspension in Plasma Thrombocyten aus 10 ml Blutvolumen in 1 ml Plasma) wurde im Eisschrank höchstens 2 - 3 Tage aufbewahrt. Zu jedem Versuch wurden 3,9 ml Giftlösungen bzw. Kontroll-Lösungen in silikonierten Gläsern in ein 25°-Wasserbad gebracht und mit 0,1 ml Thrombocyten suspension beschickt. Zwecks Konstanterhaltung des pH-Wertes verwandten wir statt der in den orientierenden Versuchen 0,85 %igen Kochsalzlösung eine Mischung aus 4 Teilen Kochsalzlösung und 1 Teil 0,1 m Veronal-Salzsäurepuffer pH 6,8 (nach d'ANS-LAX). Der Gesamtgehalt der Thrombocyten suspension an 5-HT wurde folgendermaßen festgestellt: 1 ml der thrombocytenhaltigen Kontroll-Lösung wurde mit 0,5 ml n/10 HCl 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gebracht und anschließend mit 0,5 ml n/10 NaOH neutralisiert. Wie Kontrollen zeigten, erleiden 5-HT-Lösungen vergleichbarer Konzentration dabei keinen mit unserer Methode feststellbaren Wirkungsverlust.

2. Testung von 5-HT am Magenstreifen der Ratte

Das meistverwendete Testobjekt zur biologischen Bestimmung von sehr kleinen Mengen von 5-HT ist, neben dem isolierten Meerschweinchendarm und verschiedenen Molluskenherzen (GADDUM und PAASONEN), der im Östrus isolierte Rattenuterus (ERSPAMER 1952, AMIN, CRAWFORD und GADDUM 1954).

VANE fand aber, daß diese Präparate nicht immer die für einen einfachen Versuch nötige Empfindlichkeit und Verlässlichkeit gewährleisten. Bei einer Versuchsreihe mit verschiedenen Substanzen an isolierten Mägen stellte er fest, daß der Fundus des Rattenmagens ungewöhnlich empfindlich für 5-HT ist. Diese Beobachtung wurde die Grundlage der von ihm ausgebauten Methode, die auch wir zum biologischen Nachweis von 5-HT benutzten.

Präparation: Ratten beiderlei Geschlechts werden durch Genickschlag getötet und der Magen isoliert. An der Grenze zwischen Fundus (heller Teil) und Corpus (dunkler Teil) wird der Magen getrennt (a), der Fundusteil unter Vermeidung jeglichen Druckes und Zuges vorsichtig ausgestrichen und in Tyrodelösung ausgewaschen. Dann wird er entlang der kleinen Kurvatur aufgeschnitten (b), aufgeklappt und in Richtung der gestrichelten Linie (c) in einen dünnen Streifen zerlegt (Länge je nach Größe des Badbehälters). Man muß die Längsmuskulatur des Fundus für die Kontraktion gewinnen, da ihre Empfindlichkeit gegenüber 5-HT im Vergleich zur Ringmuskulatur viel größer ist (VANE).



Bei unseren Versuchen wurden immer aus einem Magenfundus 2 Streifen von ~ 2 cm gewonnen, die im angewärmten Bad eine Arbeitslänge von 3 - 5 cm erreichten.

Wir beobachteten, daß die Empfindlichkeit des Präparates größer war, wenn der Rattenmagen bei der Isolierung nicht prall gefüllt war, und wenn die hergestellten Streifen vor dem Einspannen eine gewisse Zeit (20 - 30 Min.) in kalter Tyrodelösung lagen.

Im allgemeinen gaben Fundusstreifen von großen Ratten (160 - 180 g) mit dicken Magenwänden gute Ausschläge, hatten aber sehr starke Eigenperistaltik, während Streifen von kleinen Ratten (80 - 100 g) zwar nicht so empfindlich waren, sich aber sehr ruhig verhielten. Eine Beziehung zwischen Geschlecht der Tiere und Empfindlichkeit der Mägen konnte nicht festgestellt werden. Ein geringer Prozentsatz der Mägen sprach überhaupt nicht an, bei anderen war nur der eine der beiden präparierten Streifen brauchbar. Die Schwankungen der Ansprechbarkeit während des Versuchs waren größer als beim isolierten Meerschweinchenileum.

Das Bad hatte einen Inhalt von 18 cm^3 . Als Nährlösung wurde Tyrodelösung für Warmblüter (nach von MURALT) verwendet, die durch einen Thermostaten auf 37° gehalten und gleichmäßig von Luft durchströmt wurde. Schwache Streifen wurden mit einem kleinen Gewicht entlastet. Nach Abwarten der stets einsetzenden Dehnung wurde der Schreibhebel an die berußte Trommel angelegt. Die Hebelvergrößerung betrug 1 : 10. Nun mußte der Magenstreifen auf 5-HT eingestellt werden. Wir begannen mit niedrigen Konzentrationen (10^{-7}), um die Gefahr einer möglichen Desensibilisierung durch anfängliche Gaben hoher Konzentration auszuschalten. Die Empfindlichkeit der Präparate nimmt anfänglich zu. Wenn der Streifen auf wiederholte Giftgaben gleichmäßig ansprach, wurde mit dem eigentlichen Versuch begonnen. Die Empfindlichkeit der von uns verwendeten Präparate schwankte zwischen 10^{-7} - 10^{-8} 5-HT. Rechnet man die Verdünnung durch die Badflüssigkeit hinzu, so ergibt sich eine Nachweisbarkeit von 5-0,5 ng/ml.

Die zu prüfenden Lösungen wurden mit einer Tuberkulinspritze gleichmäßig langsam und immer gleich weit vom Magen entfernt in das Tyrodebad eingebracht; man ließ sie 90 Sekunden lang einwirken und spülte dann. Während dieser Zeit war meistens der Gipfel der Kontraktion erreicht. Die nächste Gabe erfolgte nach 4 - 5 Minuten, nachdem der überaus träge Magen in der

Zwischenzeit mit Hilfe von Belastungen auf seine Ausgangsbasis zurückgebracht worden war.

Diese von VANE entwickelte sehr empfindliche Methode kann zwar nicht als spezifisch für 5-HT angesehen werden, wenn auch Histamin kaum wirksam ist (vergl. Abb. 9). Die Acetylcholinwirkung war bei unseren Versuchen etwa gleich stark wie die von 5-HT (vergl. Abb. 10). Durch Verwendung von Hemmstoffen, wie Antihistamin, Scopolamin und Lysergsäurediäthylamid kann jedoch, wie VANE zeigte und wir selbst bestätigen können (s. S. 25 u. 26), eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen aktiven Agentien getroffen werden.

Sämtliche Konzentrationsangaben beziehen sich auf die der Badflüssigkeit zugefügten Volumina.

Verwendete Substanzen:

Serotonin - Kreatinin - Sulfat (Schuchardt). Die Mengenangaben in dieser Arbeit sind auf freies Serotonin berechnet.

Histamin - Dihydrochlorid (Merck)

Acetylcholin (Roche)

Scopolamin (Merck)

Lysergsäurediäthylamid = LSD (Sandoz A. G. Basel) in Ampullen zu 1 : 10 000 gelöst.

Gereinigtes Bienengift, Charge 1952 (H. Mack Nachf., Illertissen)

Fraktion I von Bienengift (chromatographisch von F. G. Fischer und W. P. Neumann gewonnen).

Fraktion II von Bienengift sowie Phospholipase A von Bienengift (von Habermann durch Fällung und Chromatographie gewonnen).

Nährflüssigkeit von Clostridium Welchii Stamm PB6K, gewachsen unter den Bedingungen von Logan und Mitarbeitern (Habermann).

Fraktion P I (aus der genannten Kulturflüssigkeit nach dem Verfahren von Roth und Pillemer gewonnen (Habermann)).

Digitonin (Merck)

Desoxycholsäure (Schuchardt)

Lysocithin (von Habermann nach Magistris gewonnen und durch Chromatographie an Aluminiumoxyd von ninhydrinpositiven Bestandteilen befreit).

Compound 48/80 (The Wellcome Research Laboratories).

Naja tripudians-Gift (Basilisk, Basel)

Crotalus terrificus-Gift (Basilisk, Basel)

Vipera ammodytes-Gift (Basilisk, Basel)

B) Ergebnisse:

a) Freisetzung von Serotonin aus isolierten Thrombocyten

1. Hämolysika:

Der erste Versuch wurde mit dem klassischen Hämolysikum Digitonin durchgeführt. Getestet wurden die Wirkungen der Verdünnungen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} . Nach Einstellung des Magenstreifens auf reine 5-HT-Lösung wurden die Digitoninverdünnungen ohne Thrombocytenzusatz auf ihre Wirksamkeit am Magen geprüft. 0,5 ml der Verdünnung 10^{-5} zeigte keinerlei Effekt, während 0,5 ml der Verdünnung 10^{-4} nur einen leichten Tonusanstieg hervorrief, so daß sich eine Desensibilisierung erübrigte.

Prüfung der 5-HT-Freisetzung (Standardansatz s. Methodik):

<u>Digitonin</u>	<u>Inkubationszeit (min.)</u>	<u>µg Serotonin/ml</u>
1 : 10 000	15	0,5
	55	0,5
1 : 100 000	20	0,2
	55	0,5

Der Gesamtgehalt der Thrombocyten suspension betrug 0,8 µg 5-HT/ml. Digitonin 10^{-6} setzte keine nachweisbaren 5-HT-Mengen mehr frei.

Wie auch die Tabelle zeigt, wird das Maximum der Serotoninfreisetzung bei Verwendung von Digitonin 10^{-4} schon nach kurzer Zeit erreicht, während Digitonin 10^{-5} deutlich länger dazu benötigt. Die freigesetzte Menge kam aber in keinem Fall an den Gesamtgehalt der Thrombocyten heran. Es fiel auf, daß sich unter Digitonin 1 : 10 000 die Thrombocyten suspension schnell aufhellte.

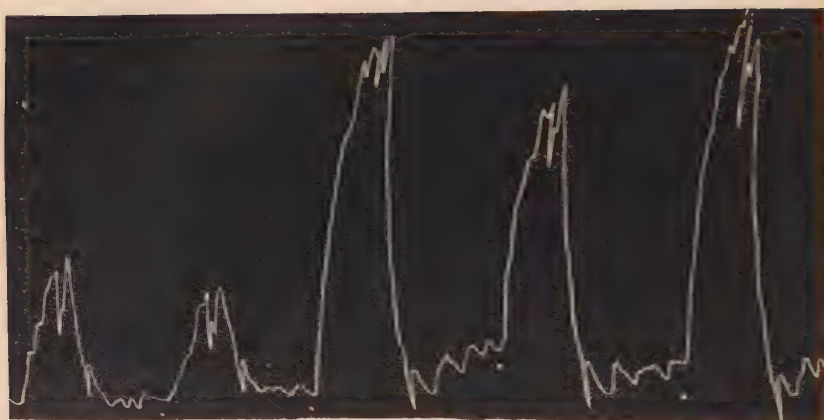


Abb. 2: Freisetzung von Serotonin aus Thrombocyten durch Digitonin 10^{-5}

1 = 0,02 μ l

5 = 0,09 μ l Serotonin

2 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Veronalpuffer

3 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Digitonin nach 20 Minuten

4 = 0,2 ml der Thrombocytensuspension in Digitonin nach 25 Minuten

Desoxycholsäure wurde unter den gleichen Bedingungen wie Digitonin auf Wirksamkeit untersucht. Geprüft wurden die Verdünnungen 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} . Die reinen Lösungen in Mengen von 0,5 ml gaben bei Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} keinen Effekt, während die Konzentrationen von 10^{-5} und 10^{-6} einen kleinen Ausschlag gaben, was aber wahrscheinlich auf die überaus große Empfindlichkeit des in diesem Fall benutzten Magenstreifens zurückzuführen ist (Empfindlichkeitsschwelle bei 10^{-8} 5-HT).

Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

Desoxycholsäure	Inkubationszeit (min.)	μ l Serotonin/ml
1 : 1 000	12	0,5
	20	0,5
	45	0,5
1 : 10 000	8	0,05
	35	0,5
	60	0,5

Bei Desoxycholsäure 10^{-3} war das Maximum schon binnen 12 Minuten erreicht, bei 10^{-4} erst nach einer Inkubationszeit von 35 Minuten. Die Konzentrationen von 10^{-5} und 10^{-6} vermochten auch nach 50 - 60 Min. Einwirkungsdauer kaum einen nennenswerten Betrag an 5-HT freizusetzen. ($< 0,02 \mu$ /ml). Der Gesamtgehalt der Blutplättchen an 5-HT betrug $0,7 \mu$ /ml, so daß eine Freisetzung von 66 % erfolgt war.

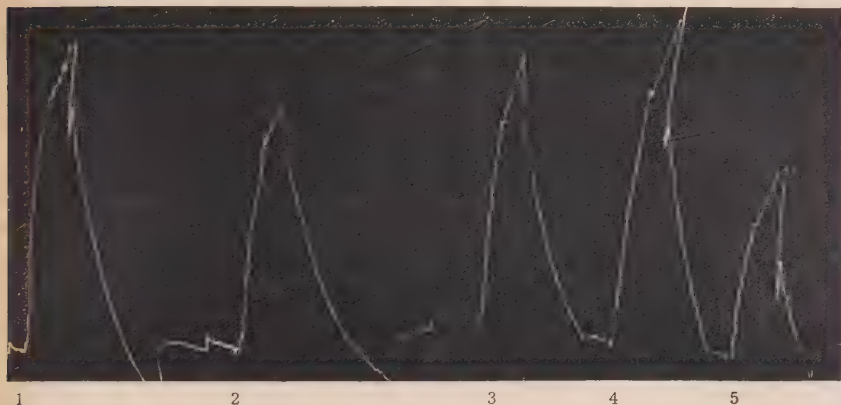


Abb. 3: Freisetzung von Serotonin aus Thrombocyten durch Desoxycholsäure 10^{-3} und 10^{-4} .

- 1 = 0,2 ml der Thrombocytensuspension in Desoxycholsäure 10^{-3} n. 45 Min.
2 = 0,2 ml der Thrombocytensuspension in Veronalpuffer 5 Min. erhitzt
3 = 0,2 ml der Thrombocytensuspension in Desoxycholsäure 10^{-4} n. 60 Min.
4 = $0,09 \mu$, 5 = $0,04 \mu$ Serotonin

In den folgenden Versuchen wurde mit Lysocithin gearbeitet, einer von HABERMANN (2) nach der Methode von MAGISTRIS gewonnenen und chromatographisch gereinigten Substanz, die stark hämolytisch wirkt. Lysocithin entsteht unter Einwirkung von Phospholipase A aus Lecithin unter Abspaltung einer Fettsäure. Auf seiner Bildung beruht die indirekt hämolysierende Wirkung von Bienen- und Schlangengiften.

Reine Lysocithinlösung 10^{-4} in einer Menge von 0,5 ml hatte keinerlei Wir-

kung am Magen, die Einwirkung auf die Blutplättchen zeigte folgendes Ergebnis:

<u>Lysocithin</u>	<u>Inkubationszeit (min.)</u>	<u>♢ Serotonin/ml</u>
1 : 10 000	20	0,2
	35	1,8
	45	1,8

Die erhitzte Kontrolle besaß einen Gesamtgehalt von 4,6 ♢ /ml 5-HT, so daß die Freisetzung durch Lysocithin 10^{-4} 40 % betrug.

Eine nochmalige Testung von Lysocithin in den Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mit frisch zubereiteten Thrombocyten ergab ein quantitativ anderes Resultat. Am sehr empfindlichen Magenstreifen gaben Dosen von 0,5 ml reiner Lysocithinverdünnung 10^{-4} auch bei Wiederholung einen kleinen Ausschlag äquivalent zu 0,002 ♢ /ml 5-HT. Die Freisetzung von Serotonin aus den Thrombocyten erfolgte im Vergleich zum ersten Versuch schneller und in prozentual höherem Ausmaß:

<u>Lysocithin</u>	<u>Inkubationszeit (min.)</u>	<u>♢ Serotonin/ml</u>
1 : 10 000	6	0,2
	55	0,9
	65	0,9

Der Gesamtgehalt an Serotonin wurde mit 0,9 ♢ /ml festgestellt, so daß diesmal eine 100 %ige Freisetzung unter den gleichen Bedingungen mit der gleichen Substanz erfolgt war. Die Angreifbarkeit verschiedener Thrombocytensuspensionen scheint also zu variieren.

Lysocithin 10^{-5} war kaum wirksam. So war nach 35 Minuten Inkubationszeit 1 ml Thrombocytensuspension 0,1 ♢ 5-HT äquivalent, was nicht ausreichend signifikant über dem Kontrollwert lag.

2. Versuche mit Bienengift:

Fraktion I (Melittin), eine zuerst von W. NEUMANN und HABERMANN elektrophoretisch und später von FISCHER und W. P. NEUMANN chromatographisch gewonnene, pharmakologisch hochaktive Komponente des Bienengiftes, wurde ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Serotoninfreisetzung geprüft.

Mit ihrer starken hämolytischen Wirkung setzt sie die Reihe der geprüften Hämolytika fort.

Angesetzt wurden unter den üblichen Bedingungen 3 Konzentrationen: Fraktion I 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} . Die vor der Testung durchgeführte Desensibilisierung mit reiner Fraktion I-Lösung 10^{-4} zeigte nach zweimaliger Gabe von 0,5 ml völlige Tachyphylaxie, während die Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-6} von vornherein keinerlei Wirkung am Magen hatten. Die Auswertung zeigte, daß

Fraktion I 10^{-4} nach einer Inkubationszeit von 75 Min. 4,6 μ /ml Serotonin freigesetzt hatte. Die Kontrolle hatte einen Gehalt von 0,2 μ /ml 5-HT, während der Gesamtwert 4,6 μ /ml 5-HT betrug; also wurde diesmal eine 100 %ige Freisetzung des an die Thrombocyten gebundenen Serotonins erreicht.

Die Testung des Ansatzes mit Fraktion I 10^{-5} zeigte folgenden Verlauf:

<u>Fraktion I</u>	<u>Inkubationszeit (min.)</u>	<u>μ Serotonin/ml</u>
1 : 100 000	5	0,3
	15	0,7
	25	0,7
	45	0,9

Bezogen auf den Gesamtwert von 4,6 μ /ml 5-HT betrug die Freisetzung hier nur 20 %.

Im Ansatz mit Fraktion I 10^{-6} wurde nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten weniger als 0,03 μ /ml 5-HT festgestellt.

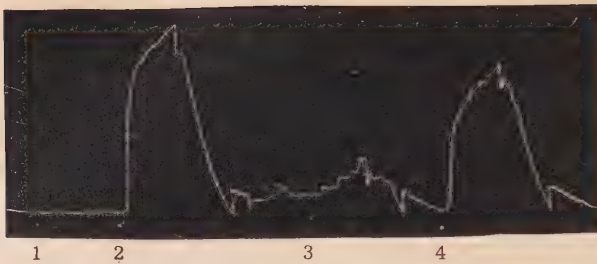


Abb. 4: Freisetzung von Serotonin aus Thrombocyten durch Bienen-
gift-Fraktion I 10^{-5} .

1 = 0,5 ml Fraktion I - Lösung

2 = 0,2 μ Serotonin

3 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Veronalpuffer

4 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Fraktion I nach
5 Minuten

Phospholipase A, ein aus Fraktion II von Bienengift von HABERMANN und W. P. NEUMANN auf chromatographischem Wege gewonnenes phospholipoidspaltendes Ferment, wurde ebenfalls bezüglich Serotoninfreisetzung untersucht. Die geprüften Lösungen hatten eine Konzentration von 1 : 25 000 und 1 : 100 000.

Während der Desensibilisierung gaben beide Konzentrationen bei der ersten Dosis von 0,5 ml starke Ausschläge, während die zweite Gabe in beiden Fällen völlige Tachyphylaxie zeigte.

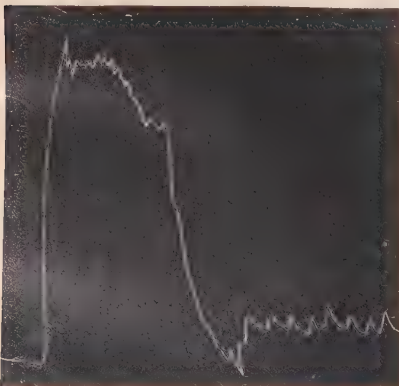


Abb. 5: Tachyphylaxie des Ma-
genstreifens gegen Phos-
pholipase A 1 : 25 000

1 = 0,5 ml Phospholi-
pase A

Nach 45 Minuten entsprach die Freisetzung durch die Lösung 1 : 25 000 nicht mehr als 0,2 μ g/ml 5-HT, gegenüber einem Kontrollwert von 0,09 μ g/ml und einem Gesamtwert von 4,6 μ g/ml 5-HT, was rund 5 % entspricht. Bei der Konzentration 10^{-5} konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber dem Leerwert festgestellt werden.

Ein weiterer Versuch mit der Phospholipase A enthaltenden Bienengiftkomponente Fraktion II in einer Konzentration von 10^{-4} ergab nur eine Freisetzung von 0,002 μ g/ml Serotonin. Damit dürfte erwiesen sein, daß nicht Fraktion II oder Phospholipase A, sondern die direkt hämolysierende Fraktion I von Bienengift das auf Thrombocyten wirkende Agens ist. Tachyphylaxie gegen Fraktion II trat erst nach der dritten Gabe von 0,5 ml auf.

3. Versuche mit Schlangengiften

Die direkte Hämolysen durch Schlangengifte tritt gegenüber der indirekten, durch Lecithinspaltung bedingten, zurück. Sie verhalten sich in dieser Hinsicht also anders als Bienengift.

Zu unseren Versuchen wurden die Gifte von Naja tripudians (Kobra), Crotalus terrificus (Bras. Klapperschlange) und Vipera ammodytes (europäische Vipernart) verwandt. Ihre Wirksamkeit auf die Blutplättchen sollte untersucht werden, nachdem die Freisetzung von Histamin durch Schlangengifte aus verschiedenen Geweben mehrfach nachgewiesen worden ist.

Kobragift wurde in den Verdünnungen 1 : 25 000 und 1 : 1 000 getestet. Bei der Desensibilisierung zeigten sich bei Dosen von 0,5 ml der Konzentration 1 : 25 000 kleine, kaum nennenswerte Ausschläge, während die Konzentration 1 : 1 000 schon bei einer Menge von 0,2 ml eine erste große Kontraktion des Magenstreifens zur Folge hatte. Anschließende Gaben von 0,5 ml jedoch führten befriedigende Tachyphylaxie herbei; das Präparat verhielt sich nach diesen starken Giftkonzentrationen sehr unruhig und entwickelte starke Eigenperistaltik.

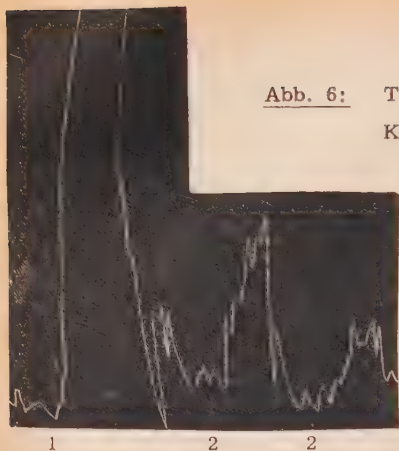


Abb. 6: Tachyphylaxie des Magenstreifens gegen
Kobragift 1 : 1 000

1 = 0,2 ml Kobragiftlösung

2 = 0,5 ml Kobragiftlösung

Die Wirkung auf die Thrombocyten war in beiden Fällen unbedeutend. Bei einer Inkubationszeit von 80 Minuten war bei der Konzentration 1 : 25 000 eine Freisetzung von weniger als 0,02 μ /ml 5-HT bei einem Gesamtgehalt von 0,9 μ /ml festzustellen. Ein gleichzeitig durchgeführter Vergleich mit der Fraktion I des Bienengiftes in einer Konzentration 1 : 25 000 zeigte bereits nach einigen Minuten eine Freisetzung von mehr als 0,5 μ /ml, also mehr als 50 %.

Auch bei der Kobragift-Konzentration 1 : 1000 kam die 5-HT-Freisetzung nicht weit über den Leerwert hinaus. Sie schwankte hier bei einer Einwirkungs-
dauer von 60 Minuten und einem Gesamtgehalt an 5-HT von 0,8 μ /ml zwischen 0,05 und 0,09 μ /ml, was uns bei dem relativ unruhigen Präparat nicht ausreichend signifikant erschien.

Bei dem Versuch mit Klapperschlangengift in Konzentrationen von 1 : 25 000 und 1 : 2 500 fiel das Ergebnis ähnlich aus. Gaben von 0,5 ml reinen Giftes 1 : 2 500 zur Desensibilisierung zeigten keinen Ausschlag, brachten das Präparat aber in merkliche Unruhe. Die Austestung mit Thrombocyten ergab nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten eine Freisetzung von weniger als 0,05 μ /ml, was dem Leerwert gleichkam, bei einem Gesamtgehalt von 0,9 μ /ml 5-HT.

Auch mit Viperngift erhielten wir bei Konzentrationen von 1 : 25 000 und 1 : 2 500 keine eindeutig positiven Ergebnisse. Bei der Desensibilisierung ergab die erste Dosis von 0,5 ml reinen Giftes 1 : 2 500 eine stärkere Kontraktion mit nachfolgender Tachyphylaxie.

Bei einem Gesamtgehalt von 0,9 μ /ml 5-HT ergab nach einer Inkubations-

zeit von rd. 60 Minuten die

Konzentration 1 : 25 000 eine Freisetzung von 0,2 μ g /ml 5-HT

Konzentration 1 : 2 500 eine Freisetzung von 0,05 μ g /ml 5-HT

Der Leerwert lag nicht deutlich niedriger.

Bei diesen Versuchen mit Schlangengiften hatte man gelegentlich den Eindruck, als ob die stärkeren Giftkonzentrationen kleinere Ausschläge geben würden als die schwächeren. Es drängte sich daher die Frage auf, ob die anwesenden Gifte das aus den Thrombocyten möglicherweise freigesetzte Serotonin abbauen.

Wir setzten daher folgenden Versuch an: Naja tripudians - und Bothrops jararaca-Giftlösungen 1 : 1 000 wurden mit Serotoninlösung 10^{-6} in Tyrodelösung im Verhältnis 1 : 1 vereinigt und bei 37° bebrütet, um einen eventuellen enzymatischen Prozess zu begünstigen. Dosen reiner Lösungen beider Gifte in Mengen von 0,5 ml gaben wiederholt Ausschläge mit nachträglicher Beunruhigung des Magens, so daß keine völlige, sondern nur eine weitgehende Unempfindlichkeit erreicht werden konnte. Eine Testung nach zweistündiger Bebrütung ergab keine Minderung des Effektes von 5-HT, so daß angenommen werden kann, daß kein wahrnehmbarer Abbau durch die Schlangengifte erfolgt.

4. Versuche mit Clostridium Welchii-Gift

Nach den Versuchen mit Hämolytica und tierischen Giften wurde eine toxinreiche, mit Clostridium Welchii Typ A bebrütete Kulturflüssigkeit (HABERMANN (2)) auf ihr Verhalten gegenüber Thrombocyten untersucht.

Bevor aber mit der eigentlichen Testung begonnen werden konnte, war es wichtig zu wissen, ob die zur Bebrütung verwendete Nährlösung und die bebrütete Kulturflüssigkeit allein schon eine magenwirksame Substanz enthielten. Sowohl die reine Nährlösung als auch die Kulturflüssigkeit erzeugten nur einen sehr kleinen, beidemale gleich großen Ausschlag, der ungefähr einem Wert von 0,03 bis 0,04 μ g /ml 5-HT entsprach.

Nach dieser Feststellung wurden Thrombocyten suspensionen mit reiner Nährlösung und mit Kulturflüssigkeit beidemale in einer Verdünnung von 1 : 10 wie üblich bei 25° angesetzt und getestet.

Die Nährlösung-Thrombocyten-Suspension kam über den Leerwert (Thrombocyten + Veronalpuffer) nicht hinaus, es erfolgte also keine 5-HT-Freisetzung, wogegen die Kulturflüssigkeit in beiden Ansätzen nach 10 Minuten Inkubationszeit einen Ausschlag im Werte von 0,25 μ g/ml 5-HT erzeugte. Nach 60 Minuten konnte der gleiche Wert registriert werden. Im Verhältnis zum Gesamtwert von 1,4 μ g/ml 5-HT also war eine Freisetzung von 20 % festzustellen.

Die nächste Testung galt der Kulturflüssigkeit in einer Konzentration von 1 : 100 mit folgenden Werten:

Kulturflüssigkeit	Inkubationszeit (min.)	μ g Serotonin/ml
1 : 100	5	0,07
	25	0,3
	50	0,5
	75	0,5

Bei einem Gesamtwert von 3,7 μ g/ml war also eine 5-HT-Freisetzung von 12,5 % zu registrieren.

Mit dem Kulturfiltrat in einer Konzentration von 1 : 1000 wurde in zwei Ansätzen eine Auswertung auf freigesetztes 5-HT unternommen, doch die Serotoninwerte deckten sich in beiden Fällen trotz großer Empfindlichkeit des Präparates nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten mit dem Leerwert.

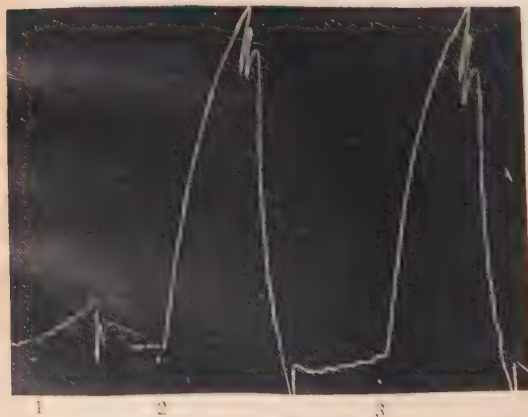


Abb. 7: Freisetzung von Serotonin aus Thrombocyten durch Kulturflüssigkeit 1 : 100

1 = 0,5 ml der Thrombocyten-suspension in Veronalpuffer nach 40 Minuten

2 = 0,1 ml der Thrombocyten-suspension in Kulturflüssigkeit

3 = 0,04 μ g Serotonin

Um einen höheren Prozentsatz der 5-HT-Freisetzung zu erhalten, wurde im folgenden Versuch ein Konzentrat der benutzten Kulturflüssigkeit angesetzt, die sog. PI-Lösung. Der nach ROTH und PILLEMER durch Methanolfällung aus der zentrifugierten Kulturflüssigkeit gewonnene und mit Succinat-Puffer extrahierte Niederschlag ist u. a. reich an Phospholipase C (ca. 200 lf-Einheiten/ml).

Die PI-Effekte sind rund 100 x stärker als die des Ausgangsmaterials. Die Suspensionen enthielten PI-Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} ; der Gehalt an proteinartigem Material war rund 200 x geringer. Eine anfängliche Gabe von 0,5 ml reiner PI-Verdünnung 10^{-2} zur Desensibilisierung rief einen ersten starken Ausschlag mit nachfolgender Tachyphylaxie hervor.

Die nachfolgende Austestung ergab:

PI-Lösung	Inkubationszeit (min.)	† Serotonin/ml
1 : 10 000	75	0,6
1 : 1 000	70	0,7 - 0,9
1 : 100	65	1,2

was bei einem Gesamtgehalt von 2,3 μ g/ml 5-HT einer Freisetzung von

25 % für PI 10^{-4}

30 - 40 % für PI 10^{-3}

50 % für PI 10^{-2}

entspricht.

Der Leerwert betrug 0,05 μ g/ml 5-HT.

Wir hatten den Eindruck, daß die Freisetzung im Laufe der Zeit bei Lösung PI 10^{-2} über 50 % hinausging. Nach 110 Minuten konnte nämlich noch ein großer Ausschlag registriert werden. Sein Wert war aber infolge starker Empfindlichkeitsschwankung des Magenstreifens nicht mehr genau zu ermitteln.

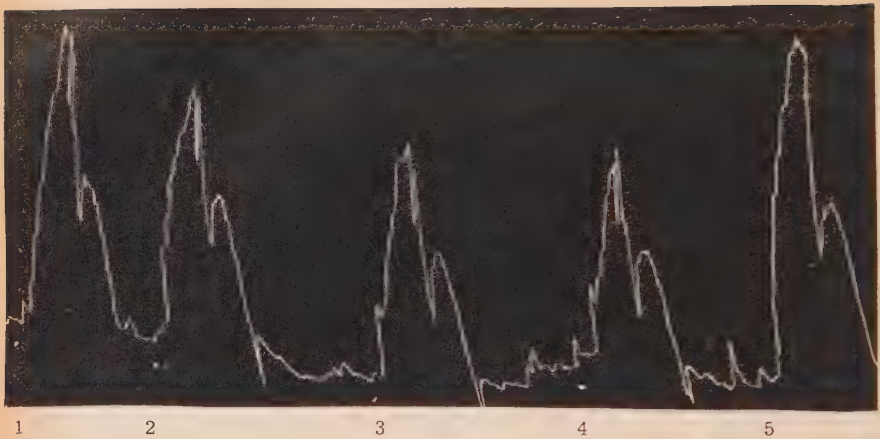


Abb. 8: Freisetzung von Serotonin aus Thrombocyten durch Kulturflüssigkeit-Fraktion P I 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} .

- 1 = 0,2 ml der Thrombocyten suspension in P I-Lösung 10^{-2} n. 65 Min.
2 = 0,2 ml der Thrombocyten suspension in P I-Lösung 10^{-3} n. 70 Min.
3 = 0,2 ml der Thrombocyten suspension in P I-Lösung 10^{-4} n. 75 Min.
4 = 0,09 μ g, 5 = 0,46 μ g Serotonin

5. Versuch mit "Compound 48/80"

BHATTACHARYA und LEWIS gelang es, in vivo aus Mastzellen von durchströmtem Rattengewebe durch den "Histaminlocker" Compound 48/80 neben Histamin auch 5-HT in sehr geringer Menge freizusetzen. Unser Versuch sollte zeigen, ob die gleiche Substanz in der Lage ist, auch aus Blutplättchen 5-HT in nachweisbarer Menge herauszulösen. 48/80 in Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} wurde zuerst allein an einem sehr empfindlichen und sich sehr ruhig verhaltenden Magenstreifenpräparat getestet.

Die erste Dosis von 0,5 ml $48/80 \cdot 10^{-4}$ gab einen sehr starken Ausschlag mit merklicher Abschwächung bei der nächstfolgenden Gabe bis zur völligen Tachyphylaxie, auch bei $48/80 \cdot 10^{-3}$; doch zeigte der zuerst ganz ruhige und sehr empfindliche Magen nach 48/80 sehr starke Eigenperistaltik bei vorläufiger Unempfindlichkeit auch gegen 5-HT, die erst im Laufe der Zeit wieder nachließ. Während wiederholter Gaben von 5-HT beruhigte sich das Präparat etwas. Nach einer Inkubationszeit von 50 - 60 Minuten wurde bei

beiden Konzentrationen ein 5-HT-Austritt von 0,05 - 0,09 μ g/ml bei einem Leerwert von 0,05 μ g/ml registriert, was nicht signifikant erscheint. Auch HUMPHREY und JAKES hatten mit 48/80 kein positives Ergebnis an Thrombocyten.

6. Hemmung durch LSD als Nachweis von 5-HT

Viele Pharmaka wurden bereits auf ihre antagonistische Wirkung gegenüber 5-HT untersucht.

ROCHA E SILVA, VALLE, ZULEIKA und PICARELLI (1953) fanden, daß Atropin die stimulierende Wirkung von 5-HT am Meerschweinchendarm unterdrückt. Mäßig lähmende Dosen von Nikotin setzten die Serotoninwirkung herab oder beseitigten sie ganz, aber auch die von Histamin, Acetylcholin und Bradykinin. Cocain dagegen blockierte nur den Effekt von 5-HT vollständig, den von Histamin und Acetylcholin nicht.

RAPPORT und KOELLE berichten über eine antagonistische Wirkung von Antihistaminika in absteigender Reihe gegenüber Histamin, Serotonin und Acetylcholin. In umgekehrter Reihenfolge soll auf die genannten Pharmaka Atropin hemmend wirken. Tachyphylaxie durch 5-HT selbst wurde an unserem Präparat bei starken Dosen beobachtet, wenn sie in einem Abstand von weniger als 3 Minuten verabreicht wurden, was auch FREYBERG (1952) und REID und RAND (1952) bestätigten.

Aus all diesen Beobachtungen wurde gefolgert, daß 5-HT über die postganglionären Fasern des cholinergischen Nervensystems wirkt.

GADDUM (1953) sowie GADDUM und HAMEED (1954) entdeckten, daß Lysergsäurediäthylamid (LSD) eine spezifisch antagonistische Wirkung gegenüber 5-HT besitzt, was GADDUM und VOGT (1956) erneut bestätigten.

SAVINI (1956) untersuchte den hemmenden Effekt von LSD und Brom-LSD sehr eingehend am Kaninchenohr. Er fand, daß beide Substanzen kräftige 5-HT-Antagonisten sind. Die Wirkung von Brom-LSD trat nach seinen Beobachtungen schneller ein, war aber auch schneller auswaschbar, im Gegensatz zu LSD, dessen Wirkung langsamer einsetzte, trotz Spülung aber 1 - 2 Stunden anhielt. Außerdem wurde nach Verabreichung von LSD starke

Erregung am Präparat festgestellt, während Brom-LSD keinen derartigen Effekt zeigte. VANE (1957) verwendete am Magenstreifenpräparat Brom-LSD zur Hemmung von 5-HT.

Wenn die aus den Thrombocyten freigesetzte glattnuskulär wirksame Substanz eine pharmakologische Ähnlichkeit mit Serotonin besitzt, mußte ihre Wirkung am Magenstreifenpräparat durch einen spezifischen Hemmstoff unterdrückt werden können. Als Antagonist wurde von uns LSD benutzt.

Zuerst wurde die Wirkungsweise von LSD gegenüber reiner 5-HT-Lösung erprobt. Als erstes konnte, wenn auch keine direkte Kontraktion, so doch eine Tonussteigerung am Präparat schon nach Gaben von $0,1 \text{ ml } 10^{-5} \text{ LSD}$ registriert werden, was zu Ergebnissen von SAVINI paßt. $0,1 \times 10^{-5} \text{ LSD}$ hemmte $0,02 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Serotonin für die restliche Dauer des Versuchs, während Serotoningaben von $0,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ bloß für eine gewisse Zeit gehemmt wurden.

$0,1 \times 10^{-4} \text{ ml LSD}$ dagegen unterdrückte die Wirkung von $0,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 5-HT für 30 Minuten trotz Zwischenspülungen fast vollständig, nach dieser Zeit war ein allmähliches Wiedererscheinen der Empfindlichkeit gegen 5-HT zu verzeichnen; doch erreichte diese nicht mehr ihren Ausgangswert. LSD in dieser Menge ließen wir bei den folgenden Versuchen jeweils von der ersten Applikation an mindestens 3 - 4 Minuten einwirken und kontrollierten durch wiederholte 5-HT-Gaben die Dauer des Schutzes.

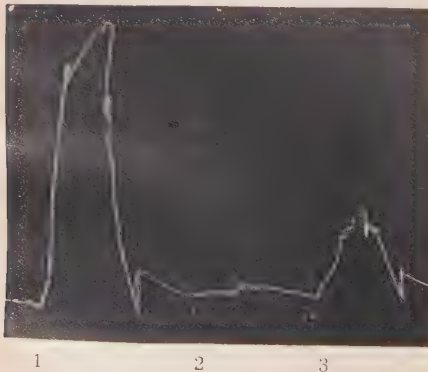


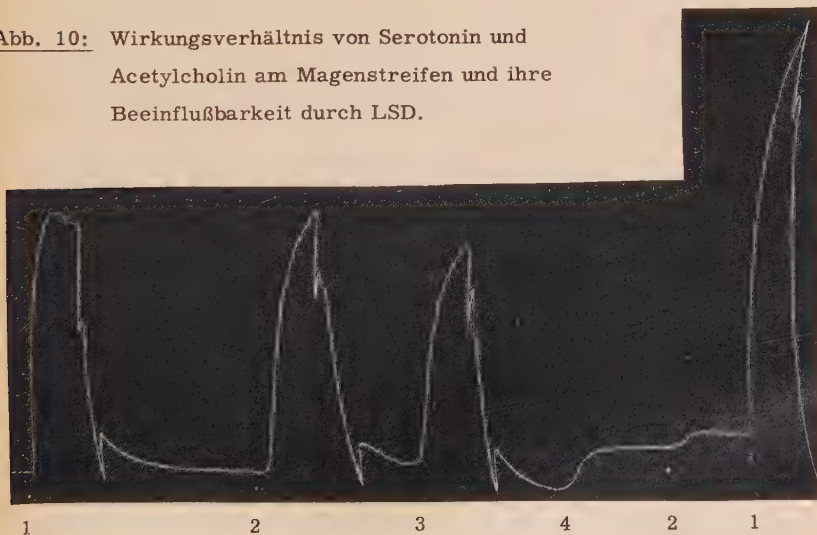
Abb. 9: Wirkungsverhältnis zwischen Serotonin und Histamin am Magenstreifen

- 1 = $0,2 \text{ } \mu\text{g}$ Serotonin
- 2 = $0,5 \text{ ml Histamin } 10^{-3}$
- 3 = $0,02 \text{ } \mu\text{g}$ Serotonin

Da Histamin in den in Frage kommenden Konzentrationen am Magen kaum oder nur in sehr starker Konzentration ansprach (vgl. Abb. 9), Acetylcholin dagegen sehr gut, wurde zum Nachweis der spezifischen Hemmwirkung von LSD gegen 5-HT mit Acetylcholin ausdifferenziert. Während $0,1 \times 10^{-4}$ LSD über 30 Minuten lang eine fast totale Unterdrückung von $0,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Serotonin herbeiführte, blieben die von Acetylcholin erzeugten Ausschläge unbeeinflusst gleich groß.

Als Nebenbeobachtung kann noch erwähnt werden, daß die Empfindlichkeit von nicht mit LSD behandelten Präparaten gegen 5-HT im Vergleich zu Acetylcholin im Laufe der Zeit zugunsten von 5-HT zunahm. Bei Acetylcholin stellte sich dagegen eine leichte Minderung der Empfindlichkeit ein.

Abb. 10: Wirkungsverhältnis von Serotonin und Acetylcholin am Magenstreifen und ihre Beeinflussbarkeit durch LSD.



1 = $0,04 \text{ } \mu\text{g}$,

3 = $0,02 \text{ } \mu\text{g}$ Acetylcholin

2 = $0,04 \text{ } \mu\text{g}$ Serotonin,

4 = $0,1 \text{ ml LSD } 10^{-4}$

Die Hemmbarkeit der aus Thrombocyten freigesetzten Substanzen wurde wie folgt nachgewiesen.

Zunächst wurde der Magenstreifen gegen die Bienengift-Fraktion II desensibilisiert (die anderen untersuchten Pharmaka zeigten in den verwendeten Verdünnungen keine eindeutige direkte Darmwirkung). Dann wurden die

thrombocytenhaltigen Ansätze im Vergleich zu 5-HT und Acetylcholin ausgetestet, LSD gegeben und die Austestung wiederholt.

Getestet wurden Thrombocytensuspensionen in:

Digitonin	1 : 100 000	in Mengen von 0,5 ml
Desoxycholsäure	1 : 10 000	in Mengen von 0,5 ml
Lysocithin	1 : 10 000	in Mengen von 0,5 ml
Fraktion I	1 : 100 000	in Mengen von 0,5 ml
Fraktion II	1 : 10 000	in Mengen von 1,0 ml
Kulturflüssigkeit		
Cl. Welchii Typ A	1 : 100	in Mengen von 1,0 ml

Total unterdrückt wurde (vgl. Abb. 11) die durch Digitonin, Desoxycholsäure, Lysocithin und Fraktion I freigesetzte Aktivität, während die Ansätze mit Fraktion II und mit Kulturflüssigkeit von *Clostridium Welchii* einen ganz kleinen Ausschlag beibehielten (vgl. Abb. 12).

Das zum Vergleich herangezogene Acetylcholin blieb in allen Fällen unverändert aktiv. Die Befunde sprechen also dafür, daß die freigesetzte aktive Substanz dem Serotonin pharmakologisch zum mindesten sehr nahe steht.

Die Ergebnisse einiger typischer Versuche mit verschiedenen Pharmaka sind abschließend in der Tabelle auf Seite 27 zusammengefaßt. Zur Diskussion dieser Ergebnisse siehe Seite 36.

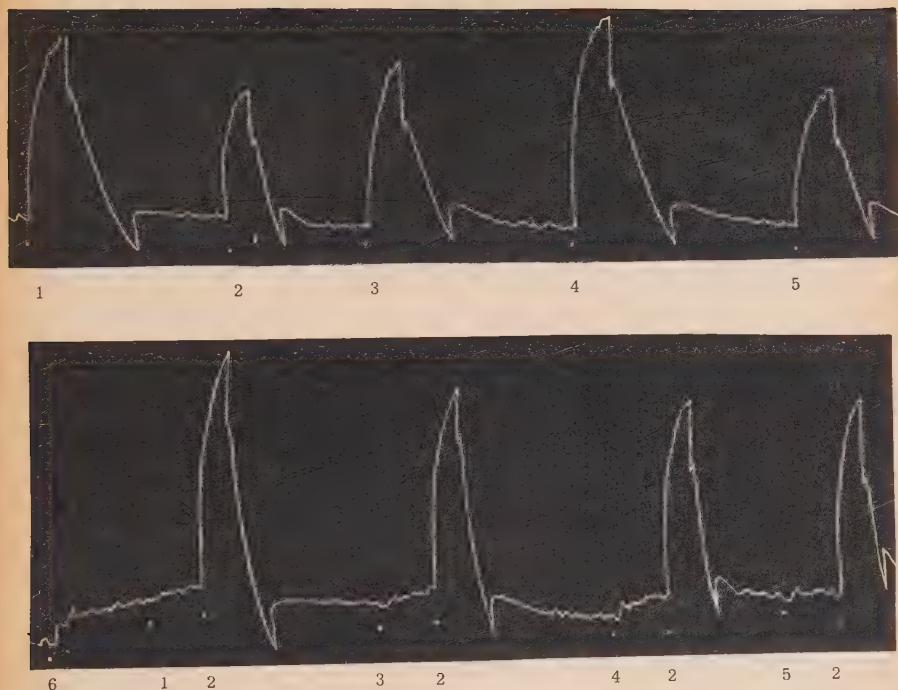


Abb. 11: Austestung des durch Hämolytika aus Thrombocyten freigesetzten Serotonins und seine Hemmung durch LSD.

1 = 0,04 μ g Serotonin

2 = 0,02 μ g Acetylcholin

3 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Digitoninlösung 10^{-5}

4 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Lysocithinlösung 10^{-4}

5 = 0,5 ml der Thrombocytensuspension in Desoxycholsäure 10^{-4}

6 = 0,1 ml LSD 10^{-4}

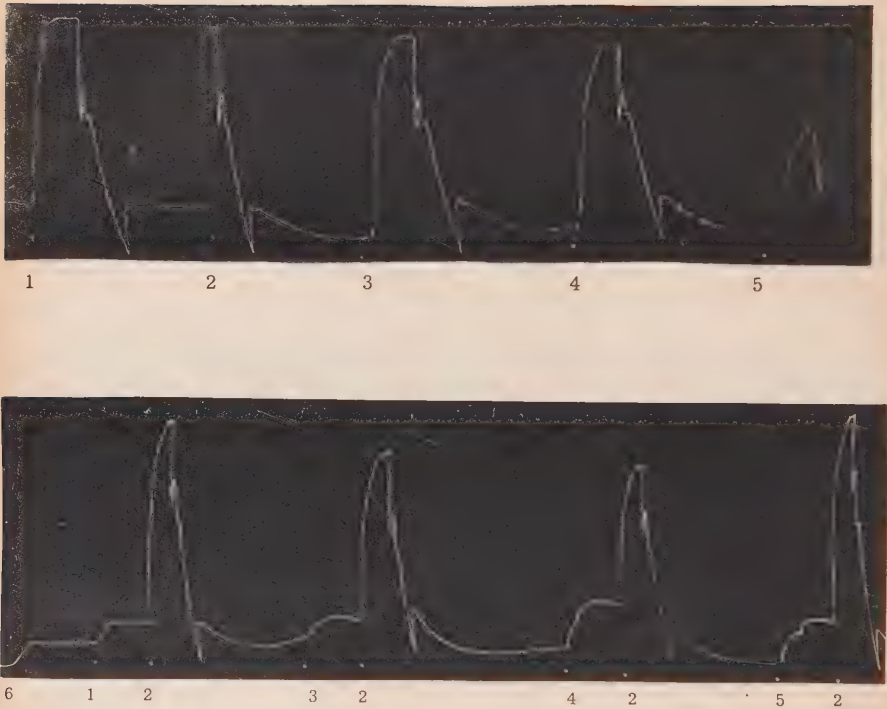


Abb. 12: Austestung des durch Fraktion I und Fraktion II des Bienen-
giftes und durch Kulturflüssigkeit von *Clostridium Welchii*
aus Thrombocyten freigesetzten Serotonins und seine Hem-
mung durch LSD.

1 = 0,04 μ l Serotonin

2 = 0,04 μ l Acetylcholin

3 = 0,5 ml der Thrombocyten suspension in Fraktion I-Lösung 10^{-5}

4 = 1,0 ml der Thrombocyten suspension in Kulturflüssigkeit 10^{-2}

5 = 1,0 ml der Thrombocyten suspension in Fraktion II-Lösung 10^{-4}

6 = 0,1 ml LSD 10^{-4}

Serotoninfreisetzung aus Thrombocyten suspensionen:

Substanz	Inkubationszeit (Min.)	g/ml	% des Gesamt- gehaltes +)
Desoxycholsäure 1 : 1 000	12, 20, 45	0, 5	66
1 : 10 000	60	0, 5	66
1 : 100 000	60	nicht signifikant	
Digitonin 1 : 10 000	60	0, 5	62
1 : 100 000	55	0, 5	62
1 : 1 000 000	60	nicht signifikant	
Lysocithin 1 : 10 000	35	1, 8	40
1 : 10 000	65	0, 9	100
1 : 100 000	60	nicht signifikant	
Clostridium Welchii Typ A			
Kulturflüssigkeit 1 : 10	10, 60	0, 25	20
1 : 100	50	0, 5	12, 5
1 : 1 000	60	nicht signifikant	
Kulturfl. P I 1 : 100	65	1, 2	50
1 : 1 000	70	0, 7 - 0, 9	30 - 40
1 : 10 000	75	0, 6	25
Bienengift-FI 1 : 10 000	75	4, 6	100
1 : 100 000	45	0, 9	20
Phospholipase A 1 : 25 000	45	0, 2	5
(Bienengift) 1 : 100 000		nicht signifikant	
Naja tripudians- gift bis 1 : 1 000	- 60	nicht signifikant	
Crotalus-terri- ficusgift bis 1 : 2 500	- 60	nicht signifikant	
Vipera-ammody- tesgift bis 1 : 2 500	- 60	nicht signifikant	

+) Der Gesamtgehalt schwankt mit der benutzten Thrombocytencharge.

b) Serotoninfreisetzung aus dem isolierten Rattenzwerchfell

Zahlreiche Publikationen berichten über Histamin-Freisetzung durch Gifte aus den verschiedensten Geweben, auch aus dem Rattenzwerchfell. Auch am hiesigen Institut wurde von HABERMANN (1) und STRIEBECK durch Bienen- und Schlangengift Histamin aus dem Rattenzwerchfell freigesetzt und am Meerschweinchendarm biologisch nachgewiesen.

BHATTACHARYA und LEWIS (2) versuchten durch Reserpin, welches 5-HT aus Gehirn, Darmtrakt und Thrombocyten in großer Menge freimacht, dieses auch aus durchströmtem Rattengewebe in vivo freizusetzen; doch sie berichten über ein negatives Ergebnis.

Den gleichen Autoren gelang es dagegen, neben Histamin auch geringe Mengen 5-HT in vivo durch den "Histaminlocker" Compound 48/80 aus Rattengewebe freizusetzen. Nach ihnen sollen 5-HT wie Histamin ihren Sitz in den Mastzellen haben.

Da Rattengewebe allgemein reich an 5-HT sein soll, versuchten wir letzteres durch tierische Gifte auch aus dem Rattenzwerchfell freizusetzen und nach der Methode von VANE am biologischen Präparat nachzuweisen.

Zunächst führten wir einige Kontrollversuche aus, nämlich die vergleichende Austestung von je zwei in reiner Tyrodelösung bebrüteten Zwerchfellhälften und ihrer "Kochwerte". Verwendet wurden, nach Abtrennung des Mittellappens, die beiden lateralen Lappen, die jeweils in 5 ml Tyrode 30 Minuten lang bei 37° bebrütet wurden.

Nach Abgießen des Überstehenden wurden die beiden Hälften jeweils mit 2,5 ml n/10 HCl versetzt und 5 Minuten ins siedende Wasserbad gestellt. Schließlich wurde mit 2,5 ml n/10 NaOH neutralisiert. Nach Zerstörung der Zellen sollte ihr Gesamtgehalt an 5-HT erfaßt werden. Die am Magenstreifen vorgenommene Austestung auf 5-HT zeigte, daß schon die Bebrütung allein einen geringen Austritt von 5-HT bewirkt:

	<u>1. Hälfte</u>		<u>2. Hälfte</u>	
	bebrütet 37°	erhitzt 100°	bebrütet	erhitzt
<u>1. Versuch</u>	0,02	0,07	0,02	0,07 ♂ Serotonin/ml
<u>2. Versuch</u>	0,05	0,2	0,05	0,2 ♂ Serotonin/ml

Am 1. Präparat war Histamin rund 1000 x weniger wirksam als 5-HT

Am 2. Präparat war Histamin rund 100 x weniger wirksam als 5-HT

Die Austestung der beiden Ansätze am Meerschweinchendarm ergab für die bebrüteten Lösungen keinen, für die erhitzten dagegen einen hohen Gehalt an Histamin. Die Histaminfreisetzung wurde von uns nicht weiter verfolgt, da dieses Problem von STRIEBECK ausführlich behandelt wurde.

In den nun folgenden Versuchen am Meerschweinchendarm sollte das Wirkungsverhältnis zwischen Histamin und 5-HT und die Hemmbarkeit durch das Antihistaminikum Avil untersucht werden.

Die Lösungen aus den beiden Zwerchfelhälfen wurden, wie vorhin beschrieben, zubereitet, und es ergaben die

bebrüteten Lösungen je 1 ml einen Histamin-Gehalt von 0,4 ♂

erhitzten Lösungen je 1 ml einen Histamin-Gehalt von 1,5 ♂

(Histamin als Dihydrochlorid berechnet)

Die Ausschläge der reinen Histamin- und Zwerchfelkochlösungen waren durch 1 ♂ Avil komplett hemmbar, während 5-HT in der histamin-äquivalenten unterdrückbaren Dosis keine wesentliche Effektminderung erfuhr. Eine kleine Abschwächung konnte beobachtet werden.

ROCHA E SILVA berichtet, im Gegensatz zu RAPPORT und KOELLE, daß die Wirkung von 5-HT durch Antihistaminika nicht abgeschwächt wurde.

Das Wirkungsverhältnis zwischen Histamin und 5-HT war

beim ersten Präparat 100 : 1

beim zweiten Präparat 10 : 1,

es fiel also, wie erwartet, zugunsten von Histamin aus.

Fraktion I am Rattenzwerchfell

Es sollte untersucht werden, ob die Bienengift-Fraktion I in der Lage ist, 5-HT aus dem Rattenzwerchfell freizusetzen. Die eine Zwerchfellhälfte wurde mit 5 ml Tyrode, die andere mit 5 ml Fraktion I-Lösung von einer Konzentration 1 : 50 000 angesetzt; beide wurden bei 37° 30 Minuten lang bebrütet. Mit beiden Hälften wurde dann die übliche Kochprobe auf Gesamtgehalt an 5-HT gemacht. Fraktion I allein war am Rattenmagenstreifen unwirksam, die Austestung der Lösungen zeigte keine Zunahme an 5-HT in der gifthaltigen Suspension. Sowohl beide bebrüteten ($< 0,02 \text{ } \mu\text{g}$ Serotonin/ml) als auch beide gekochten Ansätze zeigten gleichmäßig starke Ausschläge, es konnte also keine verstärkte 5-HT-Freisetzung durch Fraktion I festgestellt werden.

Die Austestung der gleichen Lösungen am Meerschweinchendarm auf Histamin-Freisetzung ergab nur einen angedeutet stärkeren Effekt der Suspension in Fraktion I gegenüber der Tyrode-Bebrütung. Die Kochwerte enthielten gleichmäßig große Mengen von $\sim 1,5 \text{ } \mu\text{g}$ /ml an Histamin. Tachyphylaxie gegen Fraktion I konnte auch nach mehreren Gaben nicht erreicht werden, was schon von ALBL beobachtet wurde.

Lysocithin am Rattenzwerchfell

Lysocithin wurde in einer Konzentration von 10^{-3} auf seine Wirksamkeit geprüft. Während der Tyrode-Leerwert einem 5-HT Gehalt von $0,09 \text{ } \mu\text{g}$ /ml entsprach, lag dieser nach Lysocithin-Bebrütung etwas höher.

Da der Kochwert bei der mit Tyrode bebrüteten Zwerchfellhälfte größer war ($0,3 - 0,4 \text{ } \mu\text{g}$ /ml 5-HT) als bei der mit Lysocithinlösung behandelten ($0,2 \text{ } \mu\text{g}$ /ml), kann das Lysocithin nur einen Teil des vorhandenen 5-HT freigesetzt haben.

0,5 ml reiner Lysocithinlösung gaben einen ganz schwachen Ausschlag. Wegen der Geringfügigkeit der Ergebnisse wurden die Versuche am isolierten Rattenzwerchfell eingestellt.

c) Versuche am unanästhesierten Kaninchen

Daß Reserpin aus Blutplättchen in vitro 5-HT freisetzt, wurde von CARLSSON, SHORE und BRODIE berichtet.

Von dieser Tatsache ging PLETSCHER aus bei Versuchen am Kaninchen. Er konnte nach i. v. und i. p. - Injektion von Benzochinolin-Derivaten mit sedativer Wirkung eine starke Verarmung des Gehirns an 5-HT fluorometrisch feststellen.

WAALKES und WEISSBACH gelang es ebenfalls, eine Freisetzung von 5-HT und auch von Histamin durch Reserpin in vivo im Kaninchenblut nachzuweisen. Vor und nach der intravenösen Injektion von Reserpin in verschiedenen Zeitabständen durch Herzpunktion entnommene Blutproben wurden fluorometrisch auf Histamin und 5-HT geprüft. Außerdem wurden Blutplättchenkonzentrate aus 24 Stunden vor und nach der Applikation von Reserpin entnommenem Blut nach der Methode von DILLARD hergestellt und die ermittelten Werte an Histamin und 5-HT verglichen. Mit beiden Methoden wurden positive Ergebnisse erzielt.

Durch diese Angaben und durch unsere eigenen Versuche mit Thrombocyten-suspensionen angeregt, prüften wir, ob eine Freisetzung von 5-HT in vivo am unanästhesierten Kaninchen nach Applikation unserer Substanzen am Magenstreifenpräparat nachzuweisen ist.

Die ersten Versuche beschränkten sich auf die Ermittlung von Bedingungen, unter denen der Vergleichswert, sog. Leerwert, des reinen Blutes möglichst niedrig bleibt.

Von zwei Kaninchen wurden gleichzeitig auf je 1 ml Versen (als Antikoagulans) 9 ml Blut in silikonisierte Gläser entnommen und auf ihren 5-HT-Leerwert ausgetestet. Das Blut wurde mit einer silikonisierten Tuberkulinspritze ins Bad gegeben. Allgemein konnte darauf ein merklicher Tonusanstieg, der sich in einer Unruhe des Präparates äußerte, beobachtet werden, die nach Zusatz von LSD ($0,1 \times 10^{-4}$) wieder nachließ. Die Leerwerte waren im allgemeinen groß und in ihrer Höhe unterschiedlich, - sie lagen zwischen $0,2 - 0,9 \mu\text{g/ml}$ Serotonin, - so daß sie für Vergleiche schlecht brauchbar gewesen wären. Durch LSD ($0,1 \times 10^{-4}$) waren sie weitgehend hemmbar.

Um eine Täuschung durch Acetylcholin auszuschalten, das bekanntlich im Gegensatz zu Histamin am Magenstreifen gut anspricht, mußte mit einem wirksamen Antagonisten gearbeitet werden, der Acetylcholin weitgehend hemmt, 5-HT aber unbeeinflusst läßt. Dieser war im Scopolamin (Hyoscin) gegeben (VANE).

Ein in dieser Richtung durchgeführter Versuch zeigte, daß 1 μ Scopolamin 5 μ Acetylcholin fast vollständig unterdrückt, während 5-HT seine volle Aktivität beibehält. Man hatte fast den Eindruck einer zunehmenden Beruhigung und besseren Ansprechbarkeit des Präparates gegenüber 5-HT.

Bei allen folgenden Versuchen wurde auf einen Liter Tyrode 1 ml Scopolamin 10^{-3} (Endkonz. 10^{-6}) zugesetzt und fortan am hyoscinisierten Magenstreifenpräparat gearbeitet.

Um die Möglichkeit eines vorzeitigen Thrombocytenzerfalls bei Blutentnahme und -Aufbewahrung auszuschalten, wurde fortan das mit einer silikonierten und mit Versen benetzten Tuberkulinspritze aus dem Kaninchenohr entnommene Blut direkt in das Tyrodebad des Präparates entleert.

Ein in dieser Weise durchgeführter Versuch zeigte eine völlige Unterdrückung der Acetylcholinwirkung und annehmbare, konstante Leerwerte des Blutes. LSD hemmte wieder weitgehend die Reaktion auf Blut. Auf die Blutgaben wurde erneut Beunruhigung des Präparates beobachtet.

Der erste Versuch am Kaninchen wurde mit reiner unverdünnter Kulturflüssigkeit von Cl. Welchii Typ A angestellt. Auf 1 kg Körpergewicht wurde 1 ml Kulturflüssigkeit in die Ohrvene injiziert. Nach Abwarten der in vitro als notwendig festgestellten Inkubationszeit wurden Blutproben aus Ohrvene bzw. Arterie entnommen und getestet.

Der vor der Injektion ermittelte Leerwert war hoch und entsprach einem Mittelwert von 0,5 - 0,9 μ Serotonin/ml Blut. Bei den nach der Injektion vorgenommenen Testungen nach 7 und 17 Minuten konnte keine Zunahme des Effektes, der auf eine Zunahme von 5-HT hätte schließen lassen können, registriert werden. Die Dosis an Kulturflüssigkeit war letal, nach 75 Minuten war das Kaninchen tot.

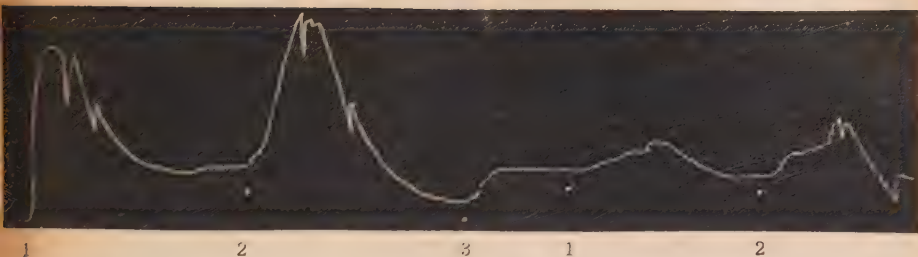


Abb. 13: Leerwertermittlung des Kaninchenblutes am hyoscinisierten Magenstreifenpräparat und seine Hemmung durch LSD.

- 1 = 0,23 μ g Serotonin
- 2 = 0,2 ml Kaninchenblut
- 3 = 0,1 ml LSD 10^{-4}

Die Blutentnahme nach der Injektion gestaltete sich äußerst schwierig, da ganz plötzlich ein allgemeiner Kollaps der Ohrgefäße eintrat.

Dem nächsten Versuchstier wurde auf 1 kg Körpergewicht 1 ml Kobragift-lösung 1 : 1 000 in die Ohrvene injiziert. Obwohl Kobragift in vitro keinen Effekt auf die Thrombocyten zeigte, sollte ermittelt werden, ob vielleicht in vivo eine 5-HT-Freisetzung erfolgt.

Der anfangs ermittelte Leerwert war mit 0,5 μ g Serotonin/ml Blut hoch, die nach der Injektion entnommenen Blutproben nach 6 und 12 Minuten zeigten keinen erhöhten Ausschlag. Die letztere Blutprobe war durch Herzpunktion gewonnen, da nach 12 Minuten das Tier ebenfalls starb.

Im folgenden Versuch erhielten 2 Kaninchen auf je 1 kg Gewicht 1 ml Bienen-giftlösung (gereinigtes Gift) 1 : 1 000 in die Ohrvene injiziert.

Beim ersten Tier konnten, bei einem Leerwert von 0,2 μ g Serotonin/ml Blut, erhöhte Ausschläge durch nach der Injektion entnommene Blutproben verzeichnet werden bei einer Versuchsdauer von 80 Minuten. Beim zweiten Tier wurde, bei einem Leerwert von 0,09 μ g 5-HT/ml Blut, nach der Giftgabe eine Zunahme des 5-HT auf $\sim$ 0,9 μ g /ml Blut beobachtet. Geprüft wurde 30 Minuten

lang.

Auch beim 3. Kaninchen, dem pro kg Gewicht 1,5 ml Pikratgift 10^{-3} injiziert wurde, konnte bei einem Leerwert von 0,2 μ 5-HT/ml Blut ein verstärkter Ausschlag nach der Gifteinwirkung registriert werden. Diese Dosis war letal, das Tier starb über Nacht.

Diese nach Bienengiftgaben durch Blut erzeugten erhöhten Ausschläge waren durch $\text{LSD } 0,1 \times 10^{-4}$ etwas abschwächbar, es konnte aber in keinem Fall eine komplette Hemmung erzielt werden.

Daß es sich um direkte Effekte des Bienengiftes handeln könnte, war kaum anzunehmen, da im Blut eine starke Verdünnung des injizierten Giftes stattfand. Beim letzten Tier hatten wir überdies das Magenstreifenpräparat zuvor desensibilisiert.

Bei allen Tieren trat nach Bienengiftinjektion periphere Gefäßkontraktion ein, was die Blutentnahme recht schwierig gestaltete.

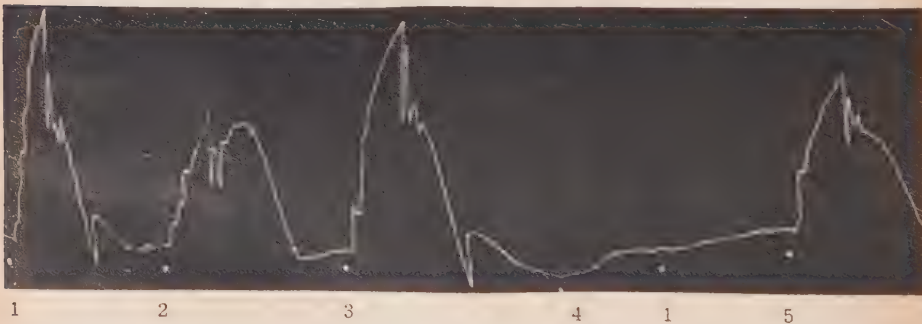


Abb. 14: Austestung der magenaktiven Substanz im Kaninchenblut vor und nach Bienengiftgabe am hyoscinisierten Magenstreifen, auch nach Zusatz von LSD.

1 = 0,09 μ Serotonin

2 = 0,2 ml Kaninchenblut als Leerwert

3 = 0,2 ml Kaninchenblut 18 Minuten nach Bienengiftgabe

4 = 0,1 ml $\text{LSD } 10^{-4}$

5 = 0,2 ml Kaninchenblut 45 Minuten nach Bienengiftgabe

III. BESPRECHUNG

Unsere Versuche zeigen, daß solche Pharmaka, welche in vitro gewaschene Erythrocyten hämolysieren, aus Thrombocyten eine wie 5-HT wirkende Substanz freisetzen. Daß es sich dabei höchstwahrscheinlich um ein Indolalkylamin handelt, geht aus den Versuchen mit Antagonisten hervor, ferner aus der unterschiedlichen Wirksamkeit am Magenstreifen der Ratte und dem Meerschweinchendarm. Ein eindeutiger Beweis für die Identität des Wirkstoffes mit Serotonin ist zwar vorläufig noch nicht erbracht; doch wurde bisher in Blutplättchen nur Serotonin als pharmakologisch aktives Indolalkylamin nachgewiesen (ZUCKER u. RAPPORT, UDENFRIEND u. WEISSBACH, TOH, CARLSSON u. SHORE, BRODIE, ODELL).

Mit der Zerstörung von Thrombocyten ist offenbar immer eine Freisetzung von Serotonin verbunden. Man weiß z. B., daß Gefriertrocknung, Schütteln, Altern, Ultraschallbehandlung und Erhitzen Serotonin aus den Plättchen austreten läßt. Besonderes Interesse wurde dem Freiwerden dieser Substanz bei der Gerinnung entgegengebracht (Übersicht bei ERSPAMER (1), ZUCKER).

Die Freisetzung von 5-HT durch Reserpin scheint einem besonderen Mechanismus zu folgen, da über hämolytische Wirkungen dieser Substanz in Dosen, welche in vivo Serotonin aus Blutplättchen und Gehirn austreten lassen, nichts bekannt ist (WAALKES u. WEISSBACH, PLETSCHER, BRODIE u. SHORE). Auch die 5-HT-Freisetzung aus Gehirn durch Benzochinolin läßt sich wohl nicht mit hämolytischen Eigenschaften dieser Substanz in strenge Beziehung setzen.

Die Freimachung von Histamin aus dem Gewebe durch Histamin-Liberatoren, wie 48/80, ist von einem Austritt von 5-HT begleitet (BHATTACHARYA u. LEWIS (1)). Auch dieser Prozess kann weder mit der Hämolysen noch mit Histamin-Freisetzung aus Plättchen in Zusammenhang gebracht werden. In unseren eigenen Versuchen setzte die Substanz 48/80 kein Serotonin aus Plättchen frei, was auch Beobachtungen von HUMPHREY und JAKUES entspricht.

Auch bei der anaphylaktischen Reaktion wurde neben Histamin Serotonin nachgewiesen (HUMPHREY u. JAKUES, SCHACHTER, PALLOTA und WARD), während auch hier intravitale Hämolysen keine Rolle spielt. HUMPHREY u.

JAQUES weisen bei dieser Reaktion auf die Möglichkeit einer Wirkung von proteolytischen Fermenten hin. Mikroskopische Beobachtungen im Phasenkontrastbild zeigten keine morphologische Veränderung der Blutplättchen. Nach den gleichen Autoren sollen kristallines Trypsin und Thrombin ebenfalls wirksam in Bezug auf Serotonin-Freimachung sein.

TOH läßt bei seinen Versuchen über die Freisetzung von 5-HT aus Thrombocyten durch Gewebsextrakte in vivo und in vitro den Weg über einen echten lytischen Prozess offen.

Das aus Geweben in Freiheit gesetzte 5-HT dürfte in den Mastzellen lokalisiert gewesen sein und zwar mit Histamin zusammen (BENDITT u. WONG, ARASE u. ROEPER, ROWLEY u. BENDITT, ERSPAMER (2), BHATTACHARYA u. LEWIS, RILEY u. WEST). Dabei bestehen interessante Zusammenhänge, indem Serotonin Histamin freisetzen soll und umgekehrt Histamin 5-HT (BHATTACHARYA u. LEWIS (1), WAALKES u. WEISSBACH, FELDBERG u. SMITH). Es bestehen offenbar eine größere Anzahl von Möglichkeiten, 5-HT-Depots zur Entleerung zu bringen, wobei hämolyseähnliche Prozesse nur einen Sonderfall darstellen.

Unsere Versuche zur Freisetzung von 5-HT durch die an Thrombocyten stark wirksamen Substanzen Fraktion I und Lysocithin führten am Rattenzwerchfell zu keinem meßbaren Ergebnis. Das könnte in einer zu niedrigen Konzentration und Dosierung der freisetzenden Gifte begründet sein.

Dagegen führen nach unseren Versuchen alle Substanzen, welche menschliche Erythrocyten zu hämolyisieren vermögen, zur Freisetzung von 5-HT aus isolierten Thrombocyten. Es scheint dabei weniger auf die Herkunft und die chemischen Eigenschaften des Hämolytikums anzukommen, als vielmehr auf sein hämolytisches Vermögen.

Phospholipase A in Schlangen- und Bienengift, welche Erythrocyten nicht direkt, sondern auf dem Umweg über Lysocithinbildung aus zugefügtem Lecithin anzugreifen vermag, ist auch an Thrombocyten verhältnismäßig wenig wirksam. Es ist wahrscheinlich, daß die Wirkungen von Hämolytika an Thrombocyten und Erythrocyten einen ähnlichen Mechanismus aufweisen.

Die Bindung von 5-HT in Thrombocyten scheint mit der strukturellen Integri-

tät des gesamten Gebildes verknüpft zu sein. Eine feste Bindung an einzelne Thrombocytenbestandteile besteht höchstens zum Teil. Immerhin haben wir bei den meisten Versuchen nicht die Freisetzung des gesamten in den Thrombocyten enthaltenen Serotonins erreicht. Zwar ist die Testmethode am Magenstreifen nicht präzise genug, um eine Genauigkeit von mehr als - 10 % zu erreichen. Meist wird man sogar mit einer etwas größeren Streuung zu rechnen haben. Jedoch sprechen die wiederholt erhaltenen Ergebnisse dafür, daß ein Teil des Serotonins pharmakologisch maskiert war. Daneben könnte allerdings auch ein enzymatischer Abbau des Pharmakons in Betracht gezogen werden.

Bis jetzt kann noch keine pharmakologische Wirkung von Insekten- und Schlangengiften auf Serotoninfreisetzung bezogen werden, obwohl manche Effekte eine solche Deutung zuließen. Es ist z. B. auffällig, daß auch das gegen Histamin relativ unempfindliche Magenstreifenpräparat auf eine Reihe von untersuchten Giften bzw. deren Komponenten (siehe Seite 14, 15 u. 20) mit einer von starker Tachyphylaxie gefolgt Kontraktion reagiert.

Auch die starken zentralen Effekte tierischer Gifte könnten mit Störungen des Serotoningehaltes des Gehirns in Zusammenhang gebracht werden, nachdem ja eine Beziehung zwischen Serotonin und bestimmten Hirnfunktionen zu bestehen scheint (Übersicht bei ERSPAMER (1)). Schließlich ist zu vermuten, daß - ähnlich, wie Substanz 48/80 - Schlangengifte und Bienengift aus perfundiertem Gewebe neben Histamin auch Serotonin freisetzen könnten. Diese Hypothese müßte aber noch durch weitere Experimente unterbaut werden.

Unsere eigenen orientierenden Versuche an Kaninchen, welche Schlangengift und Clostridium Welchii-Gift intravenös erhielten, zeigten auch bei letalen Dosen keinen eindeutigen Anstieg der auf Serotonin zu beziehenden Wirksamkeit ihres Blutes. Bei Injektion von Bienengift trat zwar eine Verstärkung der Wirkung des Blutes ein, die aber LSD-resistent war. Aus diesen Versuchen kann also nicht auf einen wesentlich erhöhten Serotoninspiegel geschlossen werden. Es ist aber durchaus möglich, daß am Ort des Bisses bzw. Stiches des jeweiligen Gifttieres mit der Gewebsschädigung eine 5-HT-Freisetzung einhergeht.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Pharmaka, welche gewaschene Erythrocyten hämolysieren, setzen aus Thrombocyten suspensionen eine serotoninartig wirkende Substanz frei. Die Wirkung auf die Thrombocyten hängt weniger von der chemischen Struktur der Substanzen als vielmehr von ihrer direkten hämolytischen Wirksamkeit ab. Im einzelnen wurden Digitonin, Desoxycholsäure, Lysocithin, Fraktion I von Bienengift und gereinigtes Gift von Clostridium Welchii als wirksam befunden. Indirekt, d. h. durch Lysolecithinbildung wirkende Stoffe, wie einige Schlangengifte und wie Fraktion II und Phospholipase A von Bienengift, waren verhältnismäßig schwach wirksam.
2. Am isolierten Rattenzwerchfell setzte Fraktion I und Lysocithin keine meßbaren Mengen 5-HT frei.
3. Bei i. v. Injektion von Schlangen- und Clostridium-Welchii-Gift an Kaninchen wurde keine Steigerung des Serotoningehaltes ihres Blutes gefunden. Injektion von Bienengift ließ eine aktive Substanz auftreten, die - nach ihrem Verhalten gegen LSD - aber nicht mit Serotonin, und auch nicht mit Acetylcholin oder Histamin identisch sein dürfte.

Herrn Privatdozenten Dr. Habermann fühle ich mich für die Überlassung des Themas sowie für das freundliche Entgegenkommen und seine wertvolle und unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit zu tiefstem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. Dr. Neumann erlaube ich mir für die freundliche Übernahme des Korreferates herzlich Dank zu sagen.

V. LITERATUR

- ALBL, F. : Inaug. Diss., Würzburg (1956)
- BENDITT, E. P.,
R. L. WONG, ARASE, M.
und E. ROEPER : Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 90, 303 (1955)
- BHATTACHARYA, B. K.,
u. G. P. LEWIS (1) : Brit. J. Pharmacol. 11, 202 (1956)
- BHATTACHARYA, B. K.,
u. G. P. LEWIS (2) : Brit. J. Pharmacol. 11, 411 (1956)
- BOQUET, P. : Venins des serpents et antivenins,
Paris 1948
- BRODIE, B. A.,
E. G. TOMICH,
R. KUNTZMANN u.
P. A. SHORE : J. Pharmacol. Exper. Therap. 119, 461 (1957)
- BRODIE, B. A.,
P. A. SHORE : Science, 123, 992 (1956)
- u. A. PLETSCHER
- CARLSSON, P. A. SHORE : J. Pharmacol. Exper. Therap. 120, 334 (1957)
- u. B. A. BRODIE
- DILLARD, G. H.,
G. BRECHER : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 796 (1951)
- u. E. P. CRONKITE
- ERSPAMER, V. (1) : Pharmacol. Rev. 6, 425 (1954)
- ERSPAMER, V. (2) : Experientia, 12, 63 (1956)
- GADDUM, H.
u. M. K. PAASONEN : Brit. J. Pharmacol. 10, 474 (1955)
- GADDUM, H.
u. M. VOGT : Brit. J. Pharmacol. 11, 175 (1956)
- HABERMANN, E. (1) : Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 232,
244 (1957)
- HABERMANN, E. (2) : unveröffentlichte Ergebnisse
- HABERMANN, E.
u. W. P. NEUMANN : Biochem. Z. 328, 465 (1957)

- HUMPHREY, J. H.
u. R. JAQUES : J. Physiol. 128, 9 (1955)
- JAQUES, R.
u. M. SCHACHTER : Brit. J. Pharmacol. 9, 49 (1954)
- MURALT, v. : Praktische Physiologie, Berlin-Heidelberg
1948
- NEUMANN, W.
u. E. HABERMANN : Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 222,
367 (1954)
- ODELL, T. T.,
F. N. GAMBLE : Fed. Proc. 12, 398 (1953)
u. J. TMUTH
- PALLOTA, A. J.
u. J. W. WARD : J. Pharmacol. Exper. Therap. 119, 174 (1957)
- PLETSCHER, A. : Science, 126, 507 (1957)
- PLETSCHER, A.,
P. A. SHORE : J. Pharmacol. Exper. Therap. 116, 84 (1956)
u. B. A. BRODIE
- RAPPORT, M. M.
u. G. B. KOELLE : Arch. internat. pharmacodyn. 92, 464 (1953)
- ROCHA e SILVA, M.,
J. R. VALLE : Brit. J. Pharmacol. 8, 378 (1953)
u. Z. P. PICARELLI
- ROTH, F. B.
u. L. PILLEMER : J. Immunol, 70, 533 (1953)
- ROWLEY, D. A.
u. E. P. BENDITT : J. Exp. Med., 103, 399 (1956)
- SCHACHTER, M. : Brit. J. Pharmacol. 8, 412 (1953)
- SAVINI, E. C. : Brit. J. Pharmacol. 11, 313 (1956)
- SILBER, B. : Inaug. Diss. Würzburg (1953)
- STRIEBECK, K. : Inaug. Diss. Würzburg (1958)
(in Vorbereitung)
- TOH, C. C. : J. Physiol. Lond. 133, 402 (1956)

- UDENFRIEND, S.
u. H. WEISSBACH : Fed. Proc. 13, 412 (1954)
- VANE, I. R. : Brit. J. Pharmacol. 12, 344 (1957)
- WAALKES, T. PH.
u. H. WEISSBACH : Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 93, 394 (1956)
- ZUCKER, M. B. : Fed. Proc. 10, 151 (1951)
- ZUCKER, M. B.
u. M. M. RAPPORT : Fed. Proc. 13, 170 (1954)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 7. 7. 1929 als Sohn des Oberförsters Florian Springer in Lednicka Lehota (CSR) geboren. Nach dem Besuch der slowakischen Volksschule trat ich in Preßburg in das deutsche Realgymnasium ein.

Die Kriegsverhältnisse zwangen meine Eltern 1944 zur Übersiedlung ins Sudetenland, von wo wir 1946 ausgesiedelt wurden und die Oberpfalz unsere neue Heimat wurde.

1950 legte ich in Neumarkt/Opf. die Reifeprüfung ab und begann, nach einjähriger Tätigkeit als Werkstudent, im Herbst 1951 mit dem zahnmedizinischen Studium in Würzburg, wo ich im Frühjahr 1956 auch das Staatsexamen ablegte.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

H. Geringer

